(51) Internationale Patentklassifikation 6: WO 98/48041 (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **A2** C120 (43) Internationales 29. Oktober 1998 (29.10.98) Veröffentlichungsdatum: PCT/DE98/01134 (81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, (21) Internationales Aktenzeichen: BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, 22. April 1998 (22.04.98) MC, NL, PT, SE). (22) Internationales Anmeldedatum: Veröffentlicht (30) Prioritätsdaten: 197 17 346.2 24. April 1997 (24.04.97) DE Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts. (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Königinstrasse 19, D-80539 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HAKENBECK, Regine [DE/DE]; Knausstrasse 10, D-12157 Berlin (DE). (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).

- (54) Title: DNA PROBES, METHOD AND KIT FOR IDENTIFYING ANTIBIOTIC-RESISTANT STRAINS OF BACTERIA
- (54) Bezeichnung: DNA-SONDEN, VERFAHREN UND KIT ZUR IDENTIFIZIERUNG ANTIBIOTIKA-RESISTENTER BAKTE-RIENSTÄMME

(57) Abstract

The invention relates to a method for identifying antibiotic—resistant strains of bacteria, especially strains of Streptococcus pneumoniae. According to the invention, the method is based on a combination of hybridization experiments and sensitivity—specific and resistance—specific probes. The invention also relates to the DNA probes and to a kit for carrying out the inventive method.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung Antibiotika-resistenter Bakterien-Stämme, insbesondere von Streptococcus pneumoniae-Stämmen, wobei das Verfahren auf einer Kombination von Hybridisierungsexperimenten mit Sensitiv-spezifischen Sonden und Resistenz-spezifischen Sonden beruht. Weiter betrifft die Erfindung die DNA-Sonden und einen Kit zur Durchführung des Verfahrens.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungam	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	$\mathbf{z}\mathbf{w}$	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

DNA-Sonden, Verfahren und Kit zur Identifizierung Antibiotika-resistenter Bakterienstämme

Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Sonden, ein Verfahren und einen Kit zur Identifizierung Antibiotika-resistenter Bakterienstämme.

Das Auftreten Antibiotika-resistenter Bakterienstämme, insbesondere von Streptococcus-Stämmen, stellt ein wachsendes Problem dar. Bisher wurden Antibiotikasusceptibilitätstests so durchgeführt, daß Bakterien isoliert wurden, eine Kultur angelegt wurde, um die minimale Antibiotika-Hemmkonzentration in einem biologischen Test zu definieren. Dieses Verfahren nimmt mindestens 1 bis 2 Tage in Anspruch. Innnerhalb dieses Zeitraums kann nicht gezielt und damit nicht optimal therapiert werden. Es besteht deshalb ein Bedarf nach einer schnelleren Identifizierung bestehender Resistenzen.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, Mittel und Verfahren bereitzustellen, mit denen Bakterienstämme, insbesondere Streptocokken-Stämme, schnell und zuverlässig auf bestehende Antibiotika-Resistenzen untersucht werden können.

Diese Aufgabe wird durch die in den Patentansprüchen angegebenen Gegenstände gelöst.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Penicillin-Resistenz von Streptococcus pneumoniae beschrieben. Dieses Prinzip gilt jedoch auch entsprechend allgemein für Bakterien und für Resistenzen gegen andere Antibiotika. Beispielhaft seien Neisserien und MRSA-Stämme (Methicillin-resistente Staphylococcus aureus), die keine ß-Lactamase produzieren, genannt.

Alle Penicillin-resistenten S. pneumoniae-Stämme besitzen veränderte Penicillin-Targetproteine (Penicillin-bindende Proteine, PBP). Die DNA-Sequenzen von Genen, die bei der Entwicklung von Penicillin-Resistenz in Streptococcus pneumoniae eine ausschlaggebende Rolle spielen, sind inzwischen in einer Anzahl von penicillinresistenten Streptokokken-Stämmen bestimmt worden. Es wurden drei Gene identifiziert, in denen bei der Entwicklung einer Penicillin-Resistenz zwischen sensitiven und resistenten Stämme Unterschiede auftreten: PBP2x, PBP1a und PBP2b.

Ein Vergleich der DNA-Sequenzen zeigt innerhalb der Gene Bereiche auf, die in allen sensitiven S. pneumoniae Stämmen vorhanden sind, aber in resistenten Stämmen verändert sind. In diesem Zusammenhang wird auf Fig. 1 verwiesen, wo gezeigt ist, daß sich die resistenten Stämme vom sensitiven Stamm R6 im PBP2x Gen mehr oder weniger deutlich unterscheiden, aber auch untereinander Unterschiede aufweisen.

Aufgrund der obigen Erkenntnis, daß es innerhalb bestimmter Gene Unterschiede zwischen Penicillin-sensitiven und -resistenten Stämmen gibt, wurden von der Anmelderin DNA-Sonden entwickelt, mit denen resistente und sensitive Stämme differenziert werden können. In diesem Zusammenhang wird auf Fig. 4 verwiesen. Die Sonden, die spezifisch für sensitive Sequenzen sind, diskriminieren Gene, die für niedrigaffine PBP-Varianten codieren, welche für Penicillin-Resistenz verantwortlich sind. Die Sonden, die spezifisch für resistente Sequenzen sind, reagieren mit einer sehr häufig vorkommenden Klasse von PBP-Varianten und können auch für epidemiologische Zwecke verwendet werden.

Von der Anmelderin wurden folgende DNA-Sonden identifiziert:

a) Sensitiv-spezifische Sonden für PBP2x. Die Zahlen unter der Rubrik "Nukleotid" beziehen sich auf die Nukleotide der publizierten Sequenz (Laible et al., Mol. Microbiol. 5, S. 1993-2002 (1991)). Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf das Codon und die Position (1,2 oder 3) im Codon des

A.,

Strukturgens. Die Anzahl der Basen im Nukleotid ist mit "mer" angegeben.

Nukleotid (Codon)	Oligonukleotid	-mer	
314-330 (105.2-110.3)	AGT CAG CAA CGG GTA AG	(1) 17	
758-774 (253.2-258.3)	AAC GAA CGA TGG ACG GT	(2) 17 .	
792-809 (264.3-270.2)	CAT TTC CAG NCC CCT CCA	(3) IS (N:bevorzugt C)	
1098-1114 (366.3-372.1)	TGC AGA TGC CAC GAT TC	(4) 17	e - - se
1302-1317 (434.2-439.3)	CTG GTC AGC TTC CTG CG	(E) 17 _{j.}	TE.
1677-1696 (559.3-566.1)	TGG TTA TCT AGT CGG GTT	<u>AA</u> (6) 20	••
1715-1731 (572.2-577.3)	CTG TAT CGA TGA GTC CG	(7)17	
2011-2029 (671.1-677.1)	AAC AGT TCT GCT GAA GAA	<u> </u>	Tight .

b) Resistenz-spezifische Sonden für PBP2x (wie oben; Sequenzen in Klammern entsprechen den korrespondierenden Abschnitten bei sensitiven Stämmen)

1065-1084 (355.3-361.3)	(AGG AGA AGT CTT TAA TAG T) TGG AGA ATA NTT CAA TAG N (I) 19 (N: bevorzugt C)
1202-1221 (401.2 -4 07.3)	(CCC TCC TTG AGC AAA AGA TG) GTC TAC TTG AAC AAA AAA TG (II) 20
1549-1566 (517.1-522.3)	(TTG GTA GGG ACG GAT CCG) TTA GTT GGG ACG GAC CCT (III) 18
1759-1776 (587.1-592.3)	(GTG ACG GTC CAA CAA CCT) GTA ACN NTT CAA CAG CCT (IV) 18 (N: bevorzugt G

- 4 -

c) Sensitiv-spezifische Sonden für PBP1a (Zahlen beziehen sich auf die Nukleotide der publizierten Sequenz des Strukturgens; Martin et al., EMBO J. 11, S. 3831-3836 (1992))

(1034-1051)	TAG GAG CAC GCC ATC AGT (in den meisten bekannten Sequenzen spez	18 zifisch)
1631-1648	GAC GAA ATG CCT ATC TTG	18
1722-1740	CTC TCA ATT TGT AGC ACC T	19
1794-1812	CTA TTC TAA CCG TCT GAC A	19

d) Resistenz-spezifische Sonden für PBP1a

945-963	(TAC CTC				19 (N:bevorzugt T
1735-1754	(GCA GCT				20 (N:bevorzugt G

e) Sensitiv-spezifische Sonden für PBP2b (Zahlen beziehen sich auf die Nukleotide der publizierten Sequenz des Strukturgens; Hakenbeck, R., Matrin, C., Dowsen, C., Grebe, T., J. Bacteriol. 176, S. 5574-5577 (1996))

N = beliebiges Nukleotid

Die obigen bzw. durch ein oder mehrere Nukleotide, bevorzugt bis 4 Nukleotide, davon abweichende Sonden eignen sich bestens, um unbekannte Streptococcus pneumoniae Stämme auf Resistenzen gegen Penicillin zu untersuchen.

Dafür werden erfindungsgemäß Bakterien aus einer Probe abzentrifugiert und im Falle von S. pneumoniae die PBP-Gene (die Resistenzdeterminanten) direkt über

22.00

262

PCR (polymerase chain reaction) wie in der Literatur beschrieben (Grebe und Hakenbeck (1996), Antimicrob. Agents Chemother. 40, S. 829-834) amplifiziert. Der Vorteil bei S. pneumoniae besteht darin, daß eine Detergenz-induzierte Lyse schnell erfolgt und damit eine PCR ohne langwierige DNA-Präparationen erfolgen kann. Da dieser Schritt bei anderen Streptokokken nicht gelingt, wird mit diesem Schritt spezifisch nur Pneumokokken-DNA amplifiziert. Alternativ wird bakterielle DNA (chromosomale und/oder extrachrosomale) gemäß Standardmethoden isoliert. Diese DNA wird mit mindestens einer Sensitiv-spezifischen Sonde und mit mindestens einer Resistenz-spezifischen Sonde unter Standardbedingungen, die dem Fachmann hinreichend bekannt sind, hybridisiert (s. z.B. Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Habor Laboratory). Bevorzugt erfolgt die Hybridisierung unter stringenten Bedingungen, wie z.B. 20°C unter dem Schmelzpunkt der hybridisierenden DNA. Die Oligonukleotide werden vorzugsweise so gewählt, daß sie ähnliche Schmelztemperaturen haben und somit mehrere in demselben Hybridisierungsansatz mit denselben Bedingungen getestet werden können (s. Fig. 2). Die Oligonukleotide werden bevorzugt markiert angeboten (P32, S35, Biotin/Avidin-System; Dioxygenin (DIG)-markiert; Fluorescein-markiert) und gegen immobilisierte DNA hybridisiert. Alternativ werden die Oligonukleotide nicht markiert auf einem Oligonukleotid-Mikroarray angeboten, und die zu hybridisierende DNA über PCR gewonnen und bei der Amplifizierung markiert.

Aus dem Hybridisierungsergebnis kann man dann schließen, ob der unbekannte Stamm Antibiotika-sensitiv ist oder nicht. Bei der Hybridisierung sollte, je nach Resistenzgen, mindestens eine sensitiv-spezifische Sonde und eine resistenzspezifische Sonde verwendet werden. Vorteilhafterweise wird die DNA des unbekannten Stamms jedoch mit mehreren sensitiv-spezifischen und Resistenzspezifischen Sonden nacheinander hybridisiert, da eine Resistenz-Abschätzung mittels nur einer Kombination von sensitiv-spezifischen Sonden und Resistenzspezifischen Sonden mit Fehlern behaftet sein kann und eher nur als grobe Abschätzung diesen kann. Dies gilt insbesondere für den Fall der Penicillinresistenzen bei Pneumokokken und Neisserien.

Bevorzugte Hybridisierungsbedingungen richten sich nach dem AT-Gehalt und Länge der Oligonukleotide. Die Wahl der geeigneten Bedingungen kann der Fachmann mit seinem Fachwissen ausführen. So werden beispielsweise 10-100 ng/ml markiertes Oligonukleotid für PBP2x (s.oben) bei einer Hybridisierungstemperatur von 45°-60°C mindestens 5 Stunden, bevorzugt über Nacht, in SSC-Hybridisierungslösung eingesetzt.

Die Oligonukleotide können auch als PCR-Primer verwendet werden, um damit einen PCR-Test aufzubauen (s. Fig. 3). Bei diesem Test kann auf die etwas zeitaufwendigere Hybridisierung verzichtet werden, allerdings müssen pro Stamm mehrere PCRs angewendet werden. Diese Methode ist vor allem für epidemiologische Zwecke geeignet.

Die Tatsache, daß weniger Sonden für PBP1a und besonders für PBP2b bekannt sind, ergibt sich aus der Tatsache, daß in PBP1a und besonders in PBP2b kleinere Genbereiche für die Resistenz von Bedeutung sind und daher auch nur kleinere Bereiche eine Sequenzvariation aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiter einen Kit zur Durchführung des obigen Verfahrens. Dieser Kit umfaßt Mittel zur Isolierung von DNA aus Bakterien bzw. zur PCR-Amplifikation spezifischer Resistenzdeterminanten, Sensitiv-spezifische DNA-Sonden und Resistenz-spezifische DNA-Sonden (Iyophilisiert bzw. als Oligonu-kleotid-Microarray), Reagenzien, Lösungen, Puffer sowie Mittel zur Hybridisierung und zum anschließenden Nachweis hybridisierter DNA. Die Sensitiv-spezifischen DNA-Sonden und Resistenz-spezifischen DNA-Sonden sind bevorzugt die oben aufgelisteten.

Die vorliegende Erfindung weist den Vorteil auf, daß innerhalb kürzester Zeit, d.h. innerhalb weniger Stunden, Bakterien, insbesondere Pneumokokken, hinsichtlich Antibiotika-Resistenz beurteilt werden können. Dies ermöglicht nachfolgend eine gezielte und effiziente Behandlung erkrankter Patienten.

.....

E Tieta

134

, TC

7527

Die Erfindung wird weiter anhand der Figuren beschrieben, welche zeigen:

Fig.1 zeigt den Vergleich von Genabschnitten des Streptococcus pneumoniae PBP2x-Gen zwischen Penicillin-sensitiven und -resistenten Stämmen; Codon 85-750

R6: Penicillin-sensitiver Stamm

andere: Penicillin-resistente Stämme

- Fig. 2 zeigt die Hybridisierung auf einem Oligonukleotid-Array

 Die Anordnung der Sonden auf dem Array ist im ersten Block der

 Figur angegeben. Die Zahlen (1) bis (8) bzw. (I) bis (IV) entsprechen der Nummerierung der oben angegebenen Sonden für PBP2x.
 - A) Stamm R6, eine sensitiver S. pneumoniae Laborstamm und stellvertretend für andere sensitive Stämme: alle Sensitiv-spezifischen Oligonukleotide (Nr. 1-8) werden erkannt, während alle vier Resistenz-spezifischen Oligonukleotide (I-IV) nicht erkannt werden.
 - B) Stamm 2349, dessen PBP2x-Gen zu einer häufig und global vorkommmenden Klasse von PBP2x-Genen resistenter Pneumokokken gehört. Nur eines der Sensitiv-spezifischen Oligonukleotide wird erkannt, da die veränderte Sequenz nicht den 3'-Bereich des Gens überdeckt. Alle anderen Sensitiv-spezifischen Oligonukleotide (Nr. 2-8) hybridisieren nicht. Alle Resistenz-spezifischen Oligonukleotide (I-IV) hybridisieren.
 - C) Stamm J19, ein resistenter Stamm mit einem PBP2x, das nur teilweise Sequenzen hat, die mit dem von Stamm 2349 übereinstimmen. Eines der Resistenz-spezifischen Oligonukleotide (III) reagiert nicht.

D) Stamm Pn12, ein resistenter Stamm aus Papua, dessen PBP2x eine ungewöhnliche Sequenz aufweist. Fünf der Sensitiv-spezifischen Oligonukleotide reagieren nicht, ein Beweis, daß das PBP2x keine durchgehend sensitive Sequenz aufweist (und daher Resistenz vermittelt). Allerdings reagieren auch keine der Resistenz-spezifischen Oligonukleotide, was anzeigt, daß eine ungewöhnliche Sequenz auch in dem "resistenten" Genbereich vorliegt. Stämme wie dieser stellen die Ausnahme dar, können aber auf Grund des Screens eindeutig erfaßt werden, vor allem wenn weitere Oligonukleotide verwendet werden, die für andere PBPs spezifisch sind.

Fig. 3 zeigt das Ergebnis von PCR-Reaktionen zur Amplifikation von S. pneumoniae R6-DNA als Auftrag auf einem Agarosegel. Als PCR-Primer wurden die oben mit (1) bis (7) gekennzeichneten PBP 2x-Sonden als "Forward-Primer" sowie jeweils Sonde (8) als "Reverse Primer" eingesetzt. Als Kontrolle wurden PCRs mit den Sonden (I) als forward-Primer und (IV) als reverse-Primer bzw. (II) als forward-Primer und (IV) als reverse-Primer durchgeführt. M = Größenmarker

Auf dem gezeigten Gel ist klar zu erkennen, daß nur die Sensitivspezifischen Sonden eine Amplifikation ergeben, während keine mit Resistenz-spezifischen Sonden stattfindet.

Fig. 4 (a) - (i) Ermittlung der erfindungsgemäßen Sonden durch Sequenzvergleiche

Die Erfindung wird weiter anhand eines Beispiels beschrieben.

BEISPIEL: Isolierung von S. pneumomiae Bakterien-DNA und nachfolgende
Testung auf bestehende Resistenz gegenüber Penicillin

Bakterien vom Stamm S. pneumoniae R6 werden in Brain-Heart-Infusion (BHI)-Medium überimpft und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Die Zellen werden abzentrifugiert und durch Resuspendieren des Sediments in 10 μ I 10 mM Tris/HCI-Puffer, pH 7,2, 0,05% Triton-X100 lysiert. Je 1 μ I der Zellsuspension werden pro 20 μ I PCR-Ansatz (0,2 μ I Taq-Polymerase, je 1 pM Oligonukleotid-primer, 2 μ I 10X PCR-Puffer, 4-6 mM MgCI₂) verwendet. Für die PCR-Reaktion sind 25 Zyklen mit 5 sec. Annealing 96°C, 5 sec. Annealing 52°C, 10 sec. Extension bei 72°C ausreichend.

A) Agarose-Gelelektrophorese

In den PCR-Reaktionen (Bedingungen s. oben) werden folgende Primerkombinationen verwendet:

forward-Primer	<u>reverse-Primer</u>
Sonde (1)	Sonde (8)
Sonde (2)	Sonde (8)
Sonde (3)	Sonde (8)
Sonde (4)	Sonde (8)
Sonde (5)	Sonde (8)
Sonde (6)	Sonde (8)
Sonde (7)	Sonde (8)
Sonde (I)	Sonde (IV)
Sonde (II)	Sonde (IV)

Die Bezeichnungen der Sonden entsprechen den oben bei den Sequenzen angegebenen Zahlen für PBP2x.

- 10 -

Je 4 μ l Aliquots der PCR-Reaktionen wurden auf ein 1,5%-iges Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Ergebnis ist in Fig. 3 gezeigt. Daraus ergibt sich, daß R6 ein sensitiver Stamm ist.

B1) Dot-Blot

S. pneumoniae R6-Bakterien-DNA wird mit üblichen Primern (Grebe u. Hakenbeck (1996), Antimicrob. Agents Chemotherap. 40, S. 829-834) in einer PCR-Reaktion (Bedingungen s. oben) amplifiziert. Die PCR-amplifizierte DNA wird durch Erhitzen denaturiert (2 min. 96°C, anschließend 4°C), jeweils 2 μ l davon werden pro Probe auf eine Nylon-Membran aufgetragen. Die DNA wird durch Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht auf der Membran fixiert, unspezifische Bindungsstellen bei 60°C in Prähybridisierungslösung (6x SSC, 5x Denhardts-Lösung, 0,1 % SDS, 50 mM Na-Phosphat-Puffer pH 6,5, 0,1 mg/ml Heringsperm-DNA) unter leichtem Schütteln für 5 Std. abgesättigt. Die Hybridisierung mit den PBP2x Sensitiv-spezifischen Oligonukleotid-Sonden (1) bis (8) bzw. den Resistenzspezifischen Sonden (I) bis (IV) erfolgt in Hybridisierungspuffer (wie Prähybridisierungslösung, jedoch mit 50 ng/ml Oligonukleotid-Sonde) über Nacht bei ca. 50°C. Das Filter wird 2 x 5 min. bei Raumtemperatur mit 2x SSC/0,1% SDS bei 55°C gewaschen. Die Proben werden mit anti-DIG-AP-Konjugat nach den Herstellerangaben (Boehringer Mannheim) angefärbt. Auch hier zeigt sich, daß nur die Sensitiv-spezifischen Sonden eine Hybridisierung ergeben, was anzeigt, daß der S. pneumoniae-Stamm R6 ein Penicillin-sensitiver Stamm ist.

B2) Oligonukleotid-Mikroarray

Methodisch wird wie oben unter B1) vorgegangen, jedoch mit dem Unterschied, daß die Oligonukleotide als fertiger Array angeboten werden und die zu hybridisierende DNA über PCR mittels DIG oder fluoreszeinmarkierter Nukleotide markiert werden muß. Das Prinzip der "high density" Mikroarray-Hybridisierungist in "Nature Biotechnology 14, S. 1675-1680, 1996" beschrieben. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Fig. 2 A gezeigt.

wije.

Patentansprüche

- 1) Verfahren zur Identifizierung einer Antibiotikaresistenz bei Bakterien, wobei das Verfahren die folgenden Schritte aufweist:
 - (a) Isolierung von Bakterien-DNA
 - (b) Hybridisierung der in Schritt (a) gewonnenen DNA mit mindestens einer Sensitiv-spezifischen DNA-Sonde und mindestens einer Resistenz-spezifischen DNA-Sonde.
- 2) Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Bakterien Streptococcus pneumoniae sind.
- 3) Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei es sich bei der Antibiotikaresistenz um Penicillinresistenz handelt.
- 4) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Sensitiv-spezifischen Sonden ausgewählt sind aus den folgenden Oligonukleotiden bzw. sich davon durch ein oder mehrere Nukleotide unterscheiden:

AGT CAG CAA CGG GTA AG
AAC GAA CGA TGG ACG GT
CAT TTC CAG NCC CCT CCA
TGC AGA TGC CAC GAT TC
CTG GTC AGC TTC CTG CG
TGG TTA TCT AGT CGG GTT AA
CTG TAT CGA TGA GTC CG
AAC AGT TCT GCT GAA GAA G
TAG GAG CAC GCC ATC AGT
GAC GAA ATG CCT ATC TTG
CTC TCA ATT TGT AGC ACC T

CTA TTC TAA CCG TCT GAC A ATC AAA TAC CTA TAT GGT CC

5) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Resistenz-spezifischen Sonden ausgewählt sind aus den folgenden Oligonukleotiden bzw. sich davon durch ein oder mehrere Nukleotide unterscheiden:

TGG AGA ATA NTT CAA TAG N
GTC TAC TTG AAC AAA AAA TG
TTA GTT GGG ACG GAC CCT
GTA ACN NTT CAA CAG CCT
CTC CGA NCA ATA CGT CTC T
GCT CCA GAT NAA ATG TTT GT.

- 6) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Sonden radioaktiv markiert sind.
- 7) Sensitiv-spezifische DNA-Sonde zur Identifizierung Penicillin-resistenter Streptococcus pneumoniae Stämme ausgewählt aus den folgenden Oligonukleotide bzw. sich davon durch ein oder mehrere Nukleotide unterscheidend:

AGT CAG CAA CGG GTA AG
AAC GAA CGA TGG ACG GT
CAT TTC CAG NCC CCT CCA
TGC AGA TGC CAC GAT TC
CTG GTC AGC TTC CTG CG
TGG TTA TCT AGT CGG GTT AA
CTG TAT CGA TGA GTC CG
AAC AGT TCT GCT GAA GAA G
TAG GAG CAC GCC ATC AGT
GAC GAA ATG CCT ATC TTG

ď,

11.6

CTC TCA ATT TGT AGC ACC T CTA TTC TAA CCG TCT GAC A ATC AAA TAC CTA TAT GGT CC

8) Resistenz-spezifische DNA-Sonde zur Identifizierung Penicillin-resistenter Streptococcus pneumoniae Stämme ausgewählt aus den folgenden Oligonukleotide bzw. sich davon durch ein oder mehrere Nukleotide unterscheidend:

TGG AGA ATA NTT CAA TAG N
GTC TAC TTG AAC AAA AAA TG
TTA GTT GGG ACG GAC CCT
GTA ACN NTT CAA CAG CCT
CTC CGA NCA ATA CGT CTC T
GCT CCA GAT NAA ATG TTT GT

9) Kit zur Identifizierung Antibiotika-resistenter Bakterienstämme aufweisend Mittel zur Isolierung von DNA aus Bakterien bzw. zur PCR-Amplifikation spezifischer Resistenzdeterminanten, Sensitiv-spezifische DNA-Sonden und Resistenz-spezifische DNA-Sonden, Reagenzien, Lösungen, Puffer sowie Mittel zur Hybridisierung und zum anschließenden Nachweis hybridisierter DNA.

1/12

Streptococcus pneumoniae PBP 2x Mosaic Genes in Penicillin Resistant Strains (codon 85 - 750)

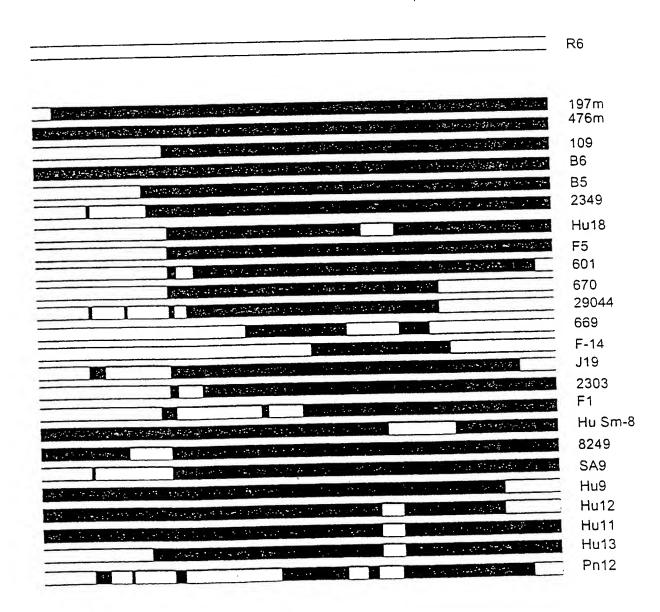


Fig. 1

Rasterbeispiel für ein Oligonukleotid-Array

1	2	3	4
5	б	7	8
I	II	III	IV

A (R6 = sensitiv)

+	+	!	÷
+	+	÷	÷
_	-	_	-

B (2349 - resistent, global vorkommender Klon)

÷	-	-	-
_	-	_	-
÷	+	÷	÷

C (J19 - resistent)

+	-		
_	_	-	_
+	÷	_	÷

D (Pn 12 - resistent, aus Papua und ungewöhnlich)

+	~	+	÷
_	-	-	_
_	_	_	_

Fig. 2

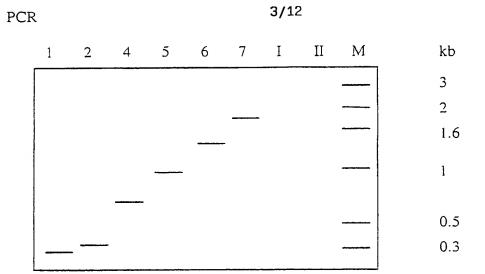


Fig. 3

USOF IN U	76MIT-BSMIT-2349-109-111NO-U18-FS-601-670-29044-M3-10712 T PCR CHROM, US R6-U11-U13-U12-U9-F1-669-F2-J19-122 1-97 fett
mmbe	numbezeichnung vertikale zahlen: erste drei ziffern = codon letzte ziffer: 1, 2, oder 3 Position im codon
	00000000000000000000000000000000000000
r MIT IT 9	
5	
4	GTCCCGATGCTGAGGATGCTGAGCACCTCTTATAATGTCTATGCGGTCATTGAGAACTATAAGTCAGGAACGGGTAAGATTCTTTACGTAAAAAAACACAATTTAACAAGGTTGCAAAAGGTGCAAGGTTGCAAGAGGTTGCAAGAAAAAAAA
	G-TC
	-9
~~ o	A
ic ic 12	7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7
	11111111111111111111111111111111111111
MIT	8-t-11-transfer in the control of th
4	GTCTTTCATAAGTATCTGGAAGAAGGAAGGAAGGAAGGAA
	.CTTG-TG-TG-ATAG-CCG-CTAG-CCG-CTAG-CCG-CTAG-CG-CTAG-C.
	5-14-1-1-1-1-1-1-1-1-1-1-1-1-1-1-1-1-1-1
	C
	C. C

11111111111111111111111111111222222222	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	22222222222222 4445556677333333444444444444444444444444	CTTGCAGGGACAGACGCATTATTACCTATGAAAAGGATCGTCGGGTAATATT	
11111111111111111111111111111111111111	- A - A - TAGT - GG - A - C - TG - C - T - C - T - T - T - T - T - T - T	22222222222222222222222222222222222222		
11111111111111111111111111111111111111		22222222222222222222222222222222222222	OAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	

g. 4 (Forts. I)

NOUNDURARARARARA I A A DIA A A A I	66 66 67 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7	
22222222222222222222222222222222222222	0 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 -	33333333333333333333333333333333333333
12222222222222222222222222222222222222	7	23.22.22.22.22.23.23.33.33.33.33.33.33.3
008	2000 4 6 1 6 1 6 1 6 1 6 1 6 1 6 1 6 1 6 1 6	22222222222222222222222222222222222222

(Forts. I

Fig. 4

13063 13	10000000000000000000000000000000000000
00000100000000000000000000000000000000	1
28823333333333333333333333333333333333	33333333444444444444444444444444444444
33333333333333333333333333333333333333	######################################
33.33.33.33.33.33.33.33.33.33.33.33.33.	333740333333333333333333333333333333333
13333333333333333333333333333333333333	######################################
100 100	88888888888888888888888888888888888888
44444444444444444444444444444444444444	3333333 2312312 724CTTT
010404333 010404333 010404333 010404333 010404333 010404333 0104043 0104043 01040	13131313131313131313131313131313131313
######################################	
33333333333333333333333333333333333333	737777788833 737777788833 737777788883 737777777777
00000000000000000000000000000000000000	4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4
44333333333333333333333333333333333333	13.3.3.3.3.3.3.3.3.3.3.3.3.3.3.3.3.3.3.
A 202349 A 2023	23333333333333333333333333333333333333
10.00	2388683 2388663 238863 2388663 2388663 2388663 2388663 2388663 2388663 2388663 238863
######################################	13333333333333333333333333333333333333
25222 252223 25223 25223 252223 252223 252223 252223 25223 25223 25223 25223 25223 25223 25223 25223 25223 25223 25223 25223 25223 25223 25223 25223	webset
UND STATE OF	R6 1050R 1050R 1050R 1050R 1050R 1018 1018 1012 1012 1012 1012 1012 1012

.SDOCID: <WO___9848041A2_I_>

44414111111111111111111111111111111111	高級事の表しては、111111111111111111111111111111111111
440014 44	ANTECON DE LA CONTROL DE LA CO
44044111111111111111111111111111111111	778 778 1111 1111 111 111 111 111 111 11
######################################	A 1 PO 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
*MONHKARARARARARARARARA AAAUAAA	11441444444444444444444444444444444444
4m5m6	
	7.000.14 1.000.
4m9m6	14441444444444444444444444444444444444
######################################	TO THE CONTRACT OF THE CONTRAC
TMHHO!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!	77.77.25.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.
42004 42004	4 10 10 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
4225 5 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4	498624 498624 498624 498624 49864 49
4206101111111111111111111111111111111111	14444444444444444444444444444444444444
42424 42	242462644
	79002
40010 40010	484445111111111111111111111111111111111
410014 420014 420014 420014 420014 420014	84444444444444444444444444444444444444
41(882)	707274
411/14	- ESCERT!!!!!!!!!!!!#!!!!#!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
4 1 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4	######################################
44mm4000000000000000000000000000000000	75 75 75 75 75 75 75 75 75 75 75 75 75 7
4	######################################
44000E111111111111111111111111111111111	20000000000000000000000000000000000000
400%4 4 4 4 4 4 4 4 4 4	77865
04444444444444444444444444444444444444	7750 500 500 500 500 500 500 500 500 500
200604 200604 200606 20	
400000 11111111111111111111111111111111	### 6 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4

. 4 (Forts. IV)

KKG 1970R 19 ** 2 /. *

		66666666666666777777777777777777777777	77777777777888888888888888888888888888	88888888888888888888888888888888888888	8888899900	990	3444555666	44444444444444444444444444444444444444	00000000000000000000000000000000000000	333444
		TTTCTCGCTGTATC	rangiccactenanate	TGATTTATCTTGTATGT	ACGGTCC	ACAACCTG	ACATTATTCAC	SCTATTCAG	19	10
		A-TGA-T			F- F-	000		; ; ; ;		
		T-KDK			e i	9		, ; ,		!
		58-1 58-1	AT	(4.64	90	90	٥		:
		3A-T				Ö	9	٠٠٠		: :
######################################		-	TK	1		9				į
A	Comparison Com	֡֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓֓	AT		66	9	9	; ; ; ;		
A	CONTINUATION CONTI	A-TGA-T		(1 0	100
No. 12	No. 12	SACTATTTTCTCGGCTGTATC		rcattttatcttgtatgt	ACGGTCC	ACAACCTG	ACATTATTCAC	SCTATTCAG	TGGGAG	2 :
A	No. 1	-ATGTG-	٥٠			0		¥		:
		- A - T ATTGC - GA - 1	£		E+ E	Ö	9			
No. No. Co. No. Co. No. Co. No. Co. No. No. Co. Co. No. No. Co. Co. Co. No. Co.	Name					90				
A. T. C. C. A. T. A. T. C. C. C. T. A. T. T. T. C.	A. A. C. C. A. A. A. C.	[AA-C	i E			B				-AAA
10. 10. 10. 10. 10. 10. 10. 10. 10. 10.	### ### ### ### ### ### #### #########	\AA-C	CACAG	CTC-C	÷ •		g	A	C-TG	
6.64.7-CA.TA.TA.ACCA.A.A.TTGGGA.A.TTGGGGA.A.A.ACCA.A.A.ACCA.A.A.A.	A	-A-TGA-1	A T							
Color Colo	Color Colo	A	-AC-T		-	0		CA		:
6.4.7C A. T.	6.65 66 66 66 66 66 66 66 66 66 66 66 66 6	AGTG-T	ACT	4		B		C		:
A T T C - A T A T A A C A A A A A A A A A A A A A	A T T C - A T A T A A A A A A A C C C C A A T A T	A-TCATA-T	TA-GGG	_	TA-T-			-T-G-CT	9	:
### C	A	- <u>T</u> <u>C</u> A <u>T</u> A-T		_	TA-T	<u></u>	9	T-0-0-L		. E
The control of the	A T C C A A T C C C C C C C C C C C C C	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			-					. :
1.00	1.000000000000000000000000000000000000	T		TC-TCA	T.	GA	CC'T T/	יכאניר - יוני-	-TT-	1
A T	10000000001111111111111111111111111111	ACTGG T	ACP			G		4		:
1000000000000000000000000000000000000	10,00000000000111111111111111111111111	A-T	· · · A T A					יר ייירר ייי		
77788899990001112231231231231231231231231231231231231	7738899990001112231231231231231231231231231231231231	166666666666666666666666666666666666666	6666666666	56666666666666666666	2222233	3333333333	3333333333333	566666666	20.4	1444
NECTTGGGGGGGTTCGGGGGGTTCGGGGGGTTTGGGGGTTTGGGGGG	### TOTAL CANCENCY TOTAL CANCENCY AND CONTRINGER CANCENCY TRANSCRICTARY TOTAL CONTRINGER CANCENCY TRANSCRICTARY TR	7778889990001112	6777888999	1222333444555666777	88899900	011122233	34445556667	177888999	25	3444
TTC C C AAA - A TA T CCAC G - TC T G - A T C AA - A TA T C AAA - A	TC-C-AAA A TA T CGAC-G-TC-T G-A T T CGAC-G-TC-	1231231231231	CTCTCTCAAT	AACAACAGCTAAGGCTTTG	GAGCAAGT	A P.G.T.C.AACA	AAGTCCTTATK	Y.TATGCC.	13	FATT
TTOCAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	TTCC CC - AAA - A - TA T		A	-T-TC	TA	T-CGAC-G-	-TC-T	J Y Y	C.A	:
TTOCAGGCCTTCAGCTTCTCTCAAA A TA TA TA TC CGAC G TC T G A T T CAA A TA TA TA TC CGAC G TC T G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T G A T T CAA A TA TC CGAC G TC T G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T T G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T T G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T T G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T T C G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T T C G A T T CAA A TA TA TC CGAC G TC T T C G A T T CAA A T T C T C T C T C T C T C T	TTCUANGCOCCTTCANGT TTCTCTCTCTCTCTCTCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· : - 7 : : : · · · · · · · · · · · ·	T-TCCAAAA	TA	T CCAC-G) L-DL-			
THOURS CONCOUNTS AND	TTOURGECTCOCTTCACTTCACATCTCACATCTTTCTTTCTTTTCT		A	7 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 -	V .	2.080-0		£	4	:
TTOURGEGUECTTTCNSCTTTCNSCTTTCNSCTTTCNSCTTTCNSCTTTCNSCTTTCTTT	TTOCARGCAGGCTTCTATATATATATATATATATATATATATATAT		Ca	T-1CCAAAA	T.A	T-CGAC-G-	-1C-1			:::
TTOURGEGGGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTC	TTOLANGCUCCTTCANCTATANA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA		Ą	-TTC	TA	T-CGAC-G-	-TC-T	3. A T	CA	:
TTOCAGGGGTTCAGATTTTTAGATTTTTTTTTTTTTTTTT	TTOURGEGUEGCTTCARETATATATATATATATATATATATATATATATATATAT	A						<u> </u>		
TTOURGEGGGCCTTCAGTTCTCAATTTCTCTCAAACAAAAAAAAAA	TTOURGECTTCARCTATATES ARE TAKED TO THE TOTAL TOTAL TOTAL TAKED TOTAL TOT		A	-T-TC-TA						
TTOURGEGUECTTENSETATESANAGGETCTCCCANTESANGCANTESANGCANTESANGCANCTCANTESANGCANTESANGCANCTCCANTESANGCANTCCANCCANCANAGANGTCCTTCANTESANGCANCTCCANTCCANCANAGANGTCCTTCANTCCANCANTCCANCANCANTCCANCANCANTCCANCANCANTCCANCANCANTCCANCANCANTCCANCANCANTCCANCANCANCANTCCANCANCANCANCANCANCANCANCANCANCANCANCAN	TTOURGEGUGCTTTCARTATATATATATATATATATATATATATATATAT	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·				100000000000000000000000000000000000000		£		
TTOLAGGC TTCACCTTCACACTTCACACTTCACCTTG CACCTTCACCACCTTCTTCTTCTTTCTTCTTCTTCTTCTT	TTOLANGCUCCTTCANCTATUMAGGACTCTCTCAACTAACCAACCTAACCCTAACCCTAACTATTTTCTTTTTT					· · · · · · · · · · · · ·				:
TTOURGECTTCACTTCACATCTCTCACATCTACACCTTTGGAGCTTTGGAGCTTTTGAGCTTTTGAGCTTTTGAGCTTTTGAGCTTTTGAGCTTTTGAGCTTTTGAGCTTTTGAGCTTTTGAGCTTTTGAGCTTTTGAGCTTTTGAGCTTTTGAGAGTTTGAGGCGGGGGGGG	TTOURGECTCTCTTCAARCTAAACCTTAAGCTTTGGAACTTAAAAAAAAAA				:	Y			: : : :	
TTC-T	CT - AA - A - T - T - T - T - T - T - T -	Ξ	AAGACTCTCTCAAT: "FFCA.	AACACAGCTAAGGCTTTE	いんさいりくつ	いいいしいいかいい	ACT COLUMN		5	TA'I'I
CT AA A A TA TA TGACGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	CT - AA - A - T - GGC-G-TC-TC-TC-TC-TC-TC-TC-TC-TC-TC-TC-TC-TC-	i	AA	-T-TC-TAAAA		G. CGAC-G	T	1 4-0		:
CT - AA - A - T - C - C - AA - A - T - C - C - C - T - C - C - T - C - C	CT - AA A A C C C C C C C C C C C C C C C			-T-TC-TA		-0.08C-0		T		
C.TAAA.CCAAATATC-TC-TC-TC-TC-TC-TC-TC-TC-TC-TC-TC-TC-	C.T.A.A.A.C.A.A.A.T.A.T.C.T.C.T.A.A.A.T.A.T		i	TTCAAAA	4.6				- Q Q	[4
CT AA A C C C C C C C C C C C C C C C C	C.T.AA.A.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C							T		
C. TAA - A - C. C C.	C.TAA-A.C.C.G.GTC-TG-G-GAC-G-GTC-TG-G-GAC-G-GTC-TG-G-GAC-G-GTC-TG-G-GAC-G-GTC-TG-AA-A-TG-GAC-G-GTC-TG-AA-TG-CGAC-G-GTC-TG-AA-TTTG-CGAC-G-GTC-TG-AA-TTG-CGAC-G-GTC-TG-AA-TG-CGAC-G-GTC-TG-AA-TG-CGAC-G-TC-TG-AA-TG-CGAC-G-TC-TG-AA-TG-CGAC-G-TC-TG-AA-TG-CGAC-G-TC-TG-AA-TG-CGAC-G-TC-TG-AA-TG-CGAC-G-TC-TG-AA-TG-CGAC-G-TC-TG-AA-TG-CGAC-G-TC-TG-AA-TG-CGAC-G-TC-TG-AA-TG-CGAC-G-TC-TG-AA-TG-CGAC-G-TC-TAA-TG-CGAC-G-TC-TAA-TG-CGAC-G-TC-TG-AA-TG-CGAC-G-TC-TG-AA-TG-CGAC-G-TC-TG-CGAC-G-TC-TG-AA-TG-CGAC-G-TC-TTC-TG-CGAC-G-TC-TG-CGAC-G-TC-TG-CGAC-G-TC-TG-CGAC-G-TC-TG-CGAC-G-TC-TG-CGAC-G-TC-TG-CGAC-G-TC-TG-CGAC-G-TC-TTC-TG-CGAC-G-TC-T-T-C-T-TC-T-TC-T-TC-T-TC-T				C 1	111111111			,	:
C-T-AA-A C-T-AA-A C-T-AA-A C-T-AA-A C-T-AA-A C-T-AA-A C-T-AA-A C-T-C-T-C-T-C-T-C-T-C-T-C-T-C-T-C-T-C-	C.TAA-A C.TCA-C C.TAA-A C.TCA-C C.TAA-A C.TCA-C C.TAA-A C.TCA-C C.TAA-A C.TCA-C C.TAA-A C.TCA-C C.CCA-C C.CCA-C C.TCA-C	2 4	A - A	(4						:
C-T-AA-A C-T-AA-A C-T-AA-A C-T-C-T C-T-T-C-T C-T-A-A-T C-T-C-T C-T-A-A-T C-T-T-C-T C-T-A-A-T C-T-T-C-T C-T-A-A-T C-T-T-C-T C-T-A-A-T C-T-T-C-T C-T-T-T C-T-T	C-T-AA-A C-T-AA-A C-T-AA-A -T-TC-T -AAA-A-T -GGC-G-TC-T -GA-A-T -GA-A-T -GGC-G-TC-T -GGC-G-T -GGC-G-TC-T -GGC-G-T -GGC-G-	TC-T	A	-T-TC-TAAA	L	G-CGAC-G-		3-AT	CA	:
T-TC-T		C-T	A	-T-TC-TAAA	L	ڼ		3-AT	CA	!
	T-TC-T		A	TC-TAAA	I	٠٠			CA	!
			A	TC-TAAA	I	O,	C-T		CA	
			<u>-</u> <u>8</u>	AK		ပုံပ	C-1-6		CA	
		AA	Ö	AA			-1-5-1-0	L		
	1000 1000 1000 1000 1000 1000 1000 100	AC-TA-A		44.	: : :	- CAP 0		F W - S		£ ;
	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		T-T-T	Z E	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1		- E		
		TC-TAATC	IIII					A		
		ATC-TAA-A		# W J-JL-I-	ę	ביים פולים פול ביים פולים פול				

77777777777777777777777777777777777777		
20000	TAGGAGAC	6
2002	. ! % ! ! ! ! ! ! ! !	9
	1911111	
570000	15:11:11	111111111
22020	18111111	1111111111
22002	1911111	
5-000	. : 2: : : : : : : :	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
~ ea m = E 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	ΙΕ:::::::	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
C-95ME111111111111111111111111111111111111	12/11/11/1	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
77777777777777777788894959 7778889494057 77788994959 77788994959 777777777777777777777777777777777	18711111	
F4F4411111111111	12::::::	
7777 11233 14777	12:::::::	
C400H111111111	IRIIIIII	
C404F111111111	ifiiidiii	
- r-anwatiliiiiiiii	انانان انتجا	1111111111
C400044 44 44 1	TACAT.	4444 444
- CARHK [[[[[[[[[[[[[[[[[[[IATITETT	HAAAAIAAAA
- C-4-4WE1111111111111	TELLIBER I	1111111111
しゅゅので・・・・・・・・	16-1-11-11	
<u></u>	1411111	
CAWWELL IIIIIIII	14(1111111	1114661111
CAWGETTITITITI	. (4)	
EAWHET I I I I I I I I	14(111111	
CAMMELLICITIES	14 1 1 1 1 1 1 1	111111111:
CAUGETTITITI	145 1 1 1 1	1111111111
C2008	ווווווו	*
CANDELLILITIES		411111111
CAUGELLILLI	i Heiman mark	111111111
	וווווון	
C40UQ111111111111111111111111111111111111	1011111	
220081111111111	15111111	1 1 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5
777777 7334444 7331231 731231 744 744 744 744 744 744 744 744	A PAGE	AAA AAA AAA
THOUSE CHARACTER I RET	الجدالجاا	I ARIII ARKA
	15!!!!!!!	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
Same of the second of the seco	15.111111	CA - AAA
CW8044	12::::::	1 1 4 4 1 1 1 1 1
rmeda i i i i i i i i i i i i i i i i i i i	1511111	
PMPME I I I I I I I I I I	. : 2 : : : : : : :	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
COCO COLLEGIO	18111111	1111114111
PWP-HOILIIIIII	18::::::	1
-momali i i i i i i i i	iziiiiii	11110011111
- revenuitiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiii		
- MOHALILILIII	iatiiiiii	
	Q + + + + + + + + + + + + + + + + + + +	1 1 6 6 6 6 6 6 6 6 6
77777777777777777777777777777777777777	14111111	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
	14 111111	11111111
23.3.3.3.3.3.3.3.3.3.3.3.3.3.3.3.3.3.3.	16111111	1 1 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5
0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.0	0 - 1 - 1 - 1	11111111111
LOO GOOOG TOO	וואָרו בּאַרוו	1 1 4 4 1 1 1 4 4 4 4
	160011011	1 10000 10000
Cumuloiiiiiiiii		1111111111
	10111111	
77777777 90013133333333 123121222 CAGATGTT		1111111111
		11111111111
	1911111	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
	!!!!!!!!!!!	!!!!!!!!!!
22238	15.	1111111111
AGCAAG	19111111	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
50000	15 1 1 1 9 1 1	!!!!!!!!!!!!
56636	15:11:11:11	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
CHOMBILLILI	18111111	1111111111
20000111111111111111111111111111111111	:9::::::	1 1 1 1 4 4 1 1 1 1 1 1
C0045	:>:::::::	11110011111
CNOWE	GCAGAAGCAAGATGTTCGTGCTAACACGCTATCAAGGACATTAAAAAAATTACATTAACTTTAACTTTAAAATTACATTAACTTTAACTTTAAAAAA	
5000 A		1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 7
~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~	10111111	
COCMOPPHENE I FEE	IONE I IE	i inches inche
COCORTITION	I F T T T T	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
72727777777777777777777777777777777777	itaiiiiii	
- NOMETHI HI DI H	TRODITOTI	1100000111111
C4444440000	IUFFIIFII	1 1 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5
22222222222222222222222222222222222222	ו ליטווי ויאו	
77777777 552222222 55366677 12313123 102113131 102113131 102113131 102113131 102113131 102113131 102113131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 1021131 10	CTACTGTG -C-1C-1TC-1TG-1TG-1TG-1TG-1TG-1TG-1TG-1TG-1TG-1TG	
COMMODILITIES STATE	10111111	1111111111
CUNHELL LITTLE	(	1   1   1   1   1   1   1   1   1   1

## THIS PAGE BLANK (USPTO)

## This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

### BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS
☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
☐ FADED TEXT OR DRAWING
☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
Потикр.

### IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

## THIS PAGE BLANK (USPTO)